

ELUSIDASI STRUKTUR MOLEKUL UK-3, UK-4 DAN UK-5, SENYAWA BIOAKTIF DARI *Streptomyces* sp. 517-02.

Muhammad Hanafi

Puslitbang Kimia Terapan - LIPI,
Kawasan PUSPIPTEK, Serpong, 15314

ABSTRAK

Senyawa baru antifungal antibiotika UK-2A, B, C dan D diekstraksi sebagai turunan dilakton cincin sembilan, diisolasi dari mycelial cake suatu actinomycete strain 517-02. Sebagai tindak lanjut untuk mendapatkan senyawa bioaktif, telah diisolasi senyawa antibiotika baru UK-3 dan senyawa UK-4 dan UK-5.

Struktur molekul UK-3 merupakan senyawa yang mirip dengan UK-2A, tetapi pada UK-3 tidak mengandung gugus metoksi (OCH₃) pada cincin piridin (C-4'). Senyawa UK-4 dan UK-5 diidentifikasi sebagai yang telah diketahui sebagai turunan isokumarin. Struktur molekul senyawa-senyawa tersebut ditentukan berdasarkan gabungan metode spektroskopi dan kimia.

Hasil uji aktivitas antibakteri dan sitotoksitas *in vitro* menunjukkan bahwa UK-3 aktif sebagai antimikroba terhadap *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* dan *Neurospora sitophila* dan menghambat pertumbuhan sel kanker P388, B16, KB dan COLO201.

ABSTRACT

New potential antifungal antibiotics UK-2A, B, C and D were elucidated as nine membered dilactone derivatives, isolated from mycelial cake of an actinomycete strain 517-02. In the continuation of a screening program in order to discover other useful bioactive metabolites from the same microbial sources, a novel UK-3 and two known compounds of UK-4 and UK-5 have been isolated.

The molecular structure of UK-3 was very similar to UK-2A, except that UK-3 did not have any methoxy group (-OCH₃) on pyridine at C'-4'. UK-4 and UK-5 were identified as known compounds of isocoumarin. These structures were elucidated based on their spectral and chemical evidence.

Biological activity assay, demonstrated that UK-3 was active as against to *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus niger* dan *Neurospora sitophila* and inhibited growth of cancer cell, P-388, B-16, KB and COLO-201.

PENDAHULUAN

Pada penelitian terdahulu senyawa antibiotika baru UK-1 yang aktif sebagai antikanker terhadap sel P388, KB16 (MIC sekitar 0.1 µg/ml) telah diisolasi dari mikroba *Streptomyces* sp. 517-02.^{1,2} Selain itu dari mikroba yang sama telah pula diisolasi senyawa antibiotika baru UK-2 yang aktif sebagai

antifungal tetapi kurang aktif terhadap sel kanker.^{3,4,5} Sebagai tindak lanjut isolasi senyawa bioaktif, telah diisolasi pula senyawa antibiotika baru UK-3 yang aktif dalam menghambat pertumbuhan mikroba dan sel kanker dan senyawa lama yang telah diisolasi dari sumber mikroorganisme lain yaitu senyawa UK-4 dan UK-5 yang merupakan senyawa turunan isokumarin.^{6,7} Senyawa UK-3 ini kemungkinan juga merupakan senyawa UK-3A, B, C&D seperti pada UK-2A, B, C&D, tetapi karena terisolasi dalam jumlah sangat sedikit, sehingga UK-3B, C&D tidak dapat dielusidasi.

Penentuan struktur molekul senyawa murni tersebut didasarkan atas metoda spektroskopi yang kemudian dibandingkan dengan data spektra senyawa yang mirip yaitu UK-2A dan senyawa 1 yang merupakan hasil sintesis. Senyawa UK-3 ini mirip sekali dengan UK-2A, sehingga konfigurasi mutlak kedua senyawa tersebut dapat diduga sama. Senyawa UK-4 telah diisolasi dari serangga *Dendroctonus ponderosae* Hopk⁶, sedangkan senyawa UK-5 yang dikenal dengan nama Reticulol, telah diisolasi dari mikroba *Streptomyces rubrirectulae*⁷, yang masing-masing merupakan turunan isokumarin.

PROSEDUR KERJA

1. Prosedur Umum

Aktivitas optik suatu senyawa terisolasi diukur dalam pelarut kloroform (CHCl₃), ditentukan dengan menggunakan alat polarimeter Jasco DIP-370. Untuk menentukan titik leleh (tl) digunakan alat Yanagimoto micro melting point. Spektrum infra merah (IR) dari sampel diukur dalam pelarut CHCl₃ dengan menggunakan alat IR Spectrophotometer Jasco A100. Penentuan berat molekul menggunakan metoda imbasan elektron spektrum massa (Electron Impact Mass Spectrum) dengan alat JEOL AX500 Spectrophotometer (30 eV), dimana sampel diinjeksikan secara langsung. Spektrum Resonansi Magnetik Nuklir (NMR) diukur dengan menggunakan alat JEOL GNM-400 MHz untuk ¹H dan 100 MHz untuk ¹³C. Nilai pergeseran kimia (δ) suatu sinyal (puncak) diukur dalam satuan ppm, sedangkan bentuk pemisahan spin-spin (spin-spin splitting) dinyatakan dalam s = singlet, d = doublet,

t = triplet, q = quartet), dd = double doublet, m = multiplet). Pada pengukuran ^1H NMR, digunakan pelarut CDCl_3 , C_6D_6 , dan $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, dan sebagai standar dalam digunakan tetramethylsilane (TMS) pada δ 0.0, pengukuran spektrum dekopling-proton ^{13}C NMR, atau INEPT (Intensive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer), dengan CDCl_3 , C_6D_6 , dan $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ berturut-turut pada δ 77,03 dan 128.00 dan 162.6 digunakan sebagai standar dalam. Pengukuran spektrum INEPT dilakukan untuk membantu menentukan gugus methyl (CH_3 , q), metilen (CH_2 , t), metin (CH , d) dan karbon kuartener (C, s).

Kromatografi lapisan tipis (TLC) dilakukan pada pelat TLC silika gel Merck GF254 dengan ketebalan 0,25 mm untuk analisa secara kualitatif. Identifikasi pemisahan spot hasil kolom kromatografi mula-mula dimonitor dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm, setelah itu dideteksi dengan menggunakan pereaksi pewarna larutan anisaldehyd-asam sulfat dalam pelarut etanol, dan dilanjutkan dengan pemanasan antara suhu 100-150 $^\circ\text{C}$.

Kromatografi kolom dikerjakan dengan menggunakan silika gel Fuji Silysia BW820 MH, sedangkan HPLC preparatif menggunakan kolom dengan ukuran 6 mm x 250 mm dan UV detektor S-310A Waters. Semua pelarut yang digunakan dalam analisa dengan menggunakan TLC dan pemurnian dengan kolom silika gel adalah pelarut teknis. Penguapan pelarut dalam melakukan maserasi atau kromatografi kolom menggunakan alat penguap berputar, dengan pemanas air pada suhu sekitar 40 $^\circ\text{C}$.

2. Isolasi dan Pemurnian.

Dari 35 L pembenihan cair setelah disaring didapatkan menjadi suatu mycelial cake.^{4,5} Mycelial cake kemudian diekstraksi dengan aseton, dipekatkan dan difraksinasi dengan kromatografi kolom silika gel (CHCl_3 sebagai eluen) didapatkan UK-3 (10 mg), senyawa murni UK-4 (53 mg) dan UK-5 (30 mg). Senyawa UK-3 dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan HPLC fasa terbalik ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} = 2:3$) dan didapatkan UK-3 sekitar 5 mg yang berbentuk kristal jarum tak berwarna.

3. Sintesis Senyawa 1.

Larutan 3-hidroksipikolinat (1 mmol) dan carbonyl diimidazole (CDI, 1,1 mmol) dalam pelarut DMF (5 ml) bebas air dibawah kondisi gas N_2 diaduk selama satu jam, kemudian larutan serin metil ester (1 mmol dalam 3 ml DMF, hasil metilasi serin dalam metanol dengan katalis HCl kering) ditambahkan melalui septum menggunakan siring pada larutan tersebut. Pengadukan dilanjutkan terus semalaman. Kedalam campuran tersebut ditambahkan air, kemudian diekstraksi dengan CH_2Cl_2 (100 ml). Lapisan organik yang didapat dicuci beberapa kali dengan air untuk menghilangkan pelarut DMF yang tersisa. Larutan organik dikeringkan dengan Na_2SO_4 anhidrus, dan uapkan dengan menggunakan

vakum rotary. Hasil yang diperoleh dimurnikan melalui kromatografi kolom ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 9:1$) dan dihasilkan senyawa 1 (76%) sebagai kristal tak berwarna, dengan nilai $[\alpha]^{30\text{D}} = +29,40$ (c 0,12, CHCl_3). IR (CHCl_3): ν_{max} : 3600, 3400, 3010, 1750, 1655, 1600, 1540, 1450, 1300, 1200, 1110, 1080, 720 cm^{-1} . EIMS (direct) m/e : 240 (M+), 222, 209, 225, 181, 163, 122, 94. ^1H dan ^{13}C NMR (Tabel 1).

4. Asetilasi dan Metilasi Senyawa UK-4.

Senyawa UK-4 diasetilasi sebagaimana umumnya reaksi asetilasi yaitu menggunakan anhidrida asetat, piridin dalam jumlah berlebih dan katalis N,N-dimethylaminopyridine (DMAP). Setelah reaksi selesai, senyawa dilarutkan dalam ether dan dicuci dengan larutan 5% HCl. Larutan ether dikeringkan dengan MgSO_4 anhidrus, kemudian pelarutnya diuapkan dan dihasilkan senyawa UK-4 (Ac).

Untuk metilasi senyawa UK-4, digunakan diazometan dengan cara melarutkan sampel dalam sedikit diklorometan. Setelah reaksi selesai pelarut diuapkan, dihasilkan senyawa UK-4(Me).

5. Uji antimikroba

Dalam pengujian antimikroba secara in vitro, contoh (UK-2A, B, C&D, UK-3 dan antimycin A) dilarutkan dalam pelarut N,N'-dimetilformamida (DMF). Nilai MIC ditentukan dengan metoda pengenceran dan ditumbuhkan pada agar nutrient 3% pada suhu 30 $^\circ\text{C}$ untuk bakteri dan pada dektrosa Sabouraud agar pada 25 $^\circ\text{C}$ untuk ragi dan jamur.⁴

6. Uji Sitotoksisitas.

Dalam uji sitotoksisitas menggunakan sel mouse melanoma B16, mouse leukemia P388, mouse fibroblast 3T3, human colon adenocarcinoma COLO201 dan human oral epidermoid carcinoma KB cells, masing-masing contoh dilarutkan dalam aseton. Untuk sel B16, 3T3, COLO201 dan KB dibiakkan dalam medium utama minimum Eagle's (Nissui Seiyaku) yang mengandung 10% serum bovine fetal (JRH Bioscience) dan sel P388 dalam medium RPMI1640 dengan 10% serum bovine fetal pada suhu 37 $^\circ\text{C}$ dalam atmosfer 5% CO_2 . Setelah dicuci dengan PBS (8 g NaCl, 0.2g KCl, 1.15g Na_2HPO_4 , 0.2 g KH_2PO_4 , dan 0.2g EDTA.2 Na per liter), sel-sel tersebut di trypsinasi dan sebanyak 2×10^4 sel dibiakkan dalam setiap lubang dari multiplate 96-lubang (96-well). Setelah contoh diencerkan secara seri dan biarkan selama 72 jam, pengaruh sitotoksik ditentukan dengan metoda kalorimetri MTT. Konsentrasi yang menunjukkan 50 % hambatan terhadap kontrol (ED_{50}) dihitung berdasarkan potensi dari efek inhibitor dari obat.⁴

t = triplet, q = quartet), dd = double doublet, m = multiplet). Pada pengukuran ^1H NMR, digunakan pelarut CDCl_3 , C_6D_6 , dan $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, dan sebagai standar dalam digunakan tetramethylsilane (TMS) pada δ 0.0, pengukuran spektrum dekopling-proton ^{13}C NMR, atau INEPT (Intensive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer), dengan CDCl_3 , C_6D_6 , dan $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ berturut-turut pada δ 77,03 dan 128.00 dan 162.6 digunakan sebagai standar dalam. Pengukuran spektrum INEPT dilakukan untuk membantu menentukan gugus methyl (CH_3 , q), metilen (CH_2 , t), metin (CH , d) dan karbon kuartener (C, s).

Kromatografi lapisan tipis (TLC) dilakukan pada pelat TLC silika gel Merck GF254 dengan ketebalan 0,25 mm untuk analisa secara kualitatif. Identifikasi pemisahan spot hasil kolom kromatografi mula-mula dimonitor dibawah lampu UV dengan panjang gelombang 254 dan 366 nm, setelah itu dideteksi dengan menggunakan pereaksi pewarna larutan anisaldehyd-asam sulfat dalam pelarut etanol, dan dilanjutkan dengan pemanasan antara suhu 100-150 $^\circ\text{C}$.

Kromatografi kolom dikerjakan dengan menggunakan silika gel Fuji Silysia BW820 MH, sedangkan HPLC preparatif menggunakan kolom dengan ukuran 6 mm x 250 mm dan UV detektor S-310A Waters. Semua pelarut yang digunakan dalam analisa dengan menggunakan TLC dan pemurnian dengan kolom silika gel adalah pelarut teknis. Penguapan pelarut dalam melakukan maserasi atau kromatografi kolom menggunakan alat penguap berputar, dengan pemanas air pada suhu sekitar 40 $^\circ\text{C}$.

2. Isolasi dan Pemurnian.

Dari 35 L pembenihan cair setelah disaring didapatkan menjadi suatu mycelial cake.^{4,5} Mycelial cake kemudian diekstraksi dengan aseton, dipekatkan dan difraksinasi dengan kromatografi kolom silika gel (CHCl_3 sebagai eluen) didapatkan UK-3 (10 mg), senyawa murni UK-4 (53 mg) dan UK-5 (30 mg). Senyawa UK-3 dimurnikan lebih lanjut dengan menggunakan HPLC fasa terbalik ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} = 2:3$) dan didapatkan UK-3 sekitar 5 mg yang berbentuk kristal jarum tak berwarna.

3. Sintesis Senyawa 1.

Larutan 3-hidroksipikolinat (1 mmol) dan carbonyl diimidazole (CDI, 1,1 mmol) dalam pelarut DMF (5 ml) bebas air dibawah kondisi gas N_2 diaduk selama satu jam, kemudian larutan serin metil ester (1 mmol dalam 3 ml DMF, hasil metilasi serin dalam metanol dengan katalis HCl kering) ditambahkan melalui septum menggunakan siring pada larutan tersebut. Pengadukan dilanjutkan terus semalaman. Kedalam campuran tersebut ditambahkan air, kemudian diekstraksi dengan CH_2Cl_2 (100 ml). Lapisan organik yang didapat dicuci beberapa kali dengan air untuk menghilangkan pelarut DMF yang tersisa. Larutan organik dikeringkan dengan Na_2SO_4 anhidrus, dan uapkan dengan menggunakan

vakum rotary. Hasil yang diperoleh dimurnikan melalui kromatografi kolom ($\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 9:1$) dan dihasilkan senyawa 1 (76%) sebagai kristal tak berwarna, dengan nilai $[\alpha]^{30\text{D}} = +29,40$ (c 0,12, CHCl_3). IR (CHCl_3): ν_{max} : 3600, 3400, 3010, 1750, 1655, 1600, 1540, 1450, 1300, 1200, 1110, 1080, 720 cm^{-1} . EIMS (direct) m/e : 240 (M+), 222, 209, 225, 181, 163, 122, 94. ^1H dan ^{13}C NMR (Tabel 1).

4. Asetilasi dan Metilasi Senyawa UK-4.

Senyawa UK-4 diasetilasi sebagaimana umumnya reaksi asetilasi yaitu menggunakan anhidrida asetat, piridin dalam jumlah berlebih dan katalis N,N-dimethylaminopyridine (DMAP). Setelah reaksi selesai, senyawa dilarutkan dalam ether dan dicuci dengan larutan 5% HCl. Larutan ether dikeringkan dengan MgSO_4 anhidrus, kemudian pelarutnya diuapkan dan dihasilkan senyawa UK-4 (Ac).

Untuk metilasi senyawa UK-4, digunakan diazometan dengan cara melarutkan sampel dalam sedikit diklorometan. Setelah reaksi selesai pelarut diuapkan, dihasilkan senyawa UK-4(Me).

5. Uji antimikroba

Dalam pengujian antimikroba secara in vitro, contoh (UK-2A, B, C&D, UK-3 dan antimycin A) dilarutkan dalam pelarut N,N'-dimetilformamida (DMF). Nilai MIC ditentukan dengan metoda pengenceran dan ditumbuhkan pada agar nutrient 3% pada suhu 30 $^\circ\text{C}$ untuk bakteri dan pada dektrosa Sabouraud agar pada 25 $^\circ\text{C}$ untuk ragi dan jamur.⁴

6. Uji Sitotoksisitas.

Dalam uji sitotoksisitas menggunakan sel mouse melanoma B16, mouse leukemia P388, mouse fibroblast 3T3, human colon adenocarcinoma COLO201 dan human oral epidermoid carcinoma KB cells, masing-masing contoh dilarutkan dalam aseton. Untuk sel B16, 3T3, COLO201 dan KB dibiakkan dalam medium utama minimum Eagle's (Nissui Seiyaku) yang mengandung 10% serum bovine fetal (JRH Bioscience) dan sel P388 dalam medium RPMI1640 dengan 10% serum bovine fetal pada suhu 37 $^\circ\text{C}$ dalam atmosfer 5% CO_2 . Setelah dicuci dengan PBS (8 g NaCl, 0.2g KCl, 1.15g Na_2HPO_4 , 0.2 g KH_2PO_4 , dan 0.2g EDTA.2 Na per liter), sel-sel tersebut di trypsinasi dan sebanyak 2×10^4 sel dibiakkan dalam setiap lubang dari multiplate 96-lubang (96-well). Setelah contoh diencerkan secara seri dan biarkan selama 72 jam, pengaruh sitotoksik ditentukan dengan metoda kalorimetri MTT. Konsentrasi yang menunjukkan 50 % hambatan terhadap kontrol (ED_{50}) dihitung berdasarkan potensi dari efek inhibitor dari obat.⁴

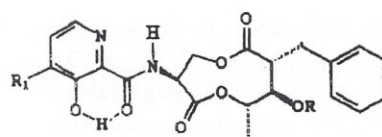
HASIL DAN PEMBAHASAN

Elusidasi dan Uji Aktivitas Antibiotika UK-3.

Senyawa UK-3 diisolasi dalam bentuk kristal jarum tak berwarna, berdasarkan hasil pengukuran EIMS dan NMR, senyawa tersebut mempunyai berat molekul 484 (M^+) dengan rumus molekul $C_{25}H_{28}N_2O_8$. Spektrum 1H dan ^{13}C NMR senyawa UK-3 (lihat Gambar 2, 3 dan Tabel 1) menunjukkan adanya satu gugus metil dublet ($4-CH_3$) pada δH 1.10 (d, $J = 6.2$ Hz, δC 17,76), satu gugus isobutiril yang terletak pada C-3 yaitu pada δH 0,98 (d, $J = 7.0$ Hz, δC 18,93); 0,96 (d, $J = 7.0$ Hz, δC 18,93), methin pada δH 2,25 (septet, $J = 7.0$ Hz δC 34,18) dan karbonil pada δC 175,03. Adanya gugus hidroksi ($3'-OH$) yang muncul pada δH 12,07 (C-3', δC 158,52) menunjukkan adanya ikatan hidrogen dengan gugus karbonil didekatnya. Satu gugus aromatik trisubstitusi muncul pada δH 6,90 (CH-4', dd, $J = 8,4, 1,5$, δC 126,94), 6,56 (CH-5', dd, $J = 8,4, 4,4$ Hz, δC 129,48), 6,67 (CH-6', dd, $J = 4,4, 1,5$ Hz, δC 139,63) dan gugus benzil nampak pada δH 3,15 dan 2,74 (masing-masing, dd, $J = 13,4, 11,7$ Hz, dan $13,4, 3,3$ Hz, δC 35,15), 7,09 (bs, 5H), δC 138,48 (C-1"), 128,82 (C-2"/C-6"), 128,54 (C-3"/5") dan 126,00 (C-4"). Disamping itu adanya gugus amida terlihat pada δH 8,55 (bd, $J = 7,3$ Hz, δC 168,97), dua gugus karbonil pada δC 171,74 (C-1) dan 169,92 (C-6), methilen (CH₂-8) pada δH 5,13 dan 3,14 (masing-masing, b, δC 65,26), methin (CH-2) pada δH 2,91 (td, $J = 9,9, 3,3$ Hz, δC 52,47), dua gugus methinoksi ($-OCH-3$) pada δH 5,35 (t, $J = 9,9$ Hz, δC 75,47), dan δH 4,97 (dq, $J = 9,9, 6,2$ Hz, δC 74,86). Berdasarkan rumus molekul ($C_{25}H_{28}N_2O_8$, jumlah ikatan tak jenuh = 14) dan jumlah ikatan tak jenuh dari data NMR adalah 13, maka dapat diketahui pula bahwa senyawa ini merupakan suatu sistem dilakton cincin sembilan.

Dari data NMR UK-3 dan data NMR UK-2A, seperti yang tertulis dalam Tabel 1, menunjukkan adanya kemiripan, kecuali pada cincin piridin agak berbeda karena pada UK-3 tidak mengandung gugus metoksi pada C-4'. Untuk itu telah disintesis senyawa 3-hidroksipikolinil serin metil ester (1), yang menunjukkan adanya kemiripan terutama pada bagian cincin piridin. Berdasarkan data tersebut, UK-3 dielusidasi sebagai suatu sistem dilakton cincin sembilan yang tersubstitusi oleh gugus benzil pada C-2, isobutiril pada C-3 dan 3'-hidroksipikolinil pada C-7.

Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa UK-2 aktif sebagai antimikroba, juga cukup aktif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Meskipun UK-3 tidak mengandung gugus metoksi pada cincin piridin ternyata masih menunjukkan kemampuannya dalam menghambat mikroba yaitu antara 0,39 - 1,56 $\mu g/ml$ (Tabel 3) dan juga cukup aktif dalam menahan pertumbuhan sel kanker yaitu antara 18 - 45 $\mu g/ml$ (Tabel 4). Hasil uji aktivitas tersebut juga relatif sama bila dibandingkan antibiotika Antimycin A dalam menghambat pertumbuhan mikroba tetapi kurang aktif dalam menghambat pertumbuhan sel kanker. Hubungan struktur molekul dan aktivitas biologi tersebut cukup menarik untuk diteliti lebih lanjut.



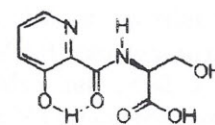
UK-2A : R = isobutiril, $R_1 = -OCH_3$

UK-2B : R = tigloil, $R_1 = -OCH_3$

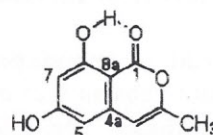
UK-2C : R = R₁ = $-OCH_3$

UK-2D : R = 2-metilbutiril, $R_1 = -OCH_3$

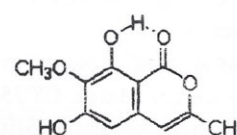
UK-3A : R = isobutiril, $R_1 = H$



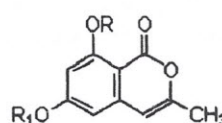
3-hidroksipikolinil serin metil ester



UK-4



UK-5



UK-4(Ac) : R = R₁ = CH_3CO-

UK-4(Me) : R = H, $R_1 = CH_3$

Gambar 1. Struktur Molekul UK-2, UK-3, UK-4, UK-5 dan Senyawa 1

Elusidasi Struktur Molekul UK-4 dan UK-5.

Senyawa UK-4 mengandung gugus hidroksi dan gugus karbonil, yang muncul pada bilangan gelombang 3300 dan 1680 cm^{-1} berdasarkan hasil pengukuran spektrum IR berturut-turut Rumus molekul senyawa tersebut adalah $C_{10}H_8O_4$, dengan berat molekul 192 (M^+) yang didapat pada pengukuran EIMS dan spektra NMR. Berdasarkan rumus molekul tersebut, dapat disimpulkan bahwa senyawa tersebut mempunyai bilangan ketidakjenuhan = 7. Dari hasil pengukuran spektra NMR (Tabel 2) diketahui bahwa senyawa UK-4 memperlihatkan adanya satu gugus keton, satu ikatan tak jenuh dan satu gugus aromatik. Dengan demikian senyawa tersebut selain mengandung satu cincin aromatik juga masih mengandung satu cincin lain. Hasil metilasi senyawa UK-4 dengan diazometan hanya dihasilkan turunan monometil ether, satu gugus hidroksi lainnya tidak dapat dimetilasi karena adanya ikatan hidrogen dengan gugus karbonil. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa gugus karbonil tersebut merupakan suatu cincin lakton. Sedangkan hasil asetilasi dengan menggunakan Ac_2O dan piridin secara berlebih dan katalis DMAP didapatkan turunan senyawa diasetil UK-4(Ac). Hasil ini mendukung adanya dua gugus hidroksi pada senyawa tersebut.

Berdasarkan pengukuran spektrum 1H NMR, senyawa UK-4 mengandung 1 gugus metil tersier pada δ 2,01 (s), tiga proton olefinik pada δ 6,12 (H-4, bs), 6,56 dan 6,77 (masing-masing, H-5, H-7, d, $J = 2,1$ Hz). Nilai J 2,1 Hz menunjukkan bahwa kedua proton tersebut mempunyai posisi meta. Tambahan sinyal metilen muncul pada δ 2,3 dan 2,4

(CH₂-2, AB geminal, d, J_{gem} = 17 Hz). Sedangkan pengukuran spektrum ¹³C NMR senyawa UK-4 juga menunjukkan adanya gugus-gugus tersebut di atas (Tabel 2), olefinik karbon pada δ 154,27 (C-3, s), 140,45 (C-4a, s), 164,29 (C-6, s) dan 99,08 (C-8a, s) serta gugus lakton pada δ 166,59 (C-1, s). Berdasarkan data tersebut di atas, diperkirakan senyawa UK-4 mempunyai kerangka struktur isokumarin yang mengandung dua gugus hidroksi tersier. Struktur molekul senyawa tersebut kemudian dikonfirmasi dengan data spektra dari literatur, dan senyawa tersebut dielusidasi sebagaimana tergambar pada struktur molekul UK-4.

Senyawa UK-5 mempunyai berat molekul 222 (M⁺), dengan rumus molekul C₁₁H₁₀O₅ dan mempunyai 7 bilangan ketidakjenuhan, didasarkan hasil pengukuran EIMS dan spektra NMR. Pengukuran spektrum NMR senyawa tersebut menunjukkan adanya satu gugus keton, satu buah ikatan rangkap dan satu gugus aromatik. Dengan demikian senyawa tersebut juga mengandung satu buah cincin lakton selain aromatik.

Dari hasil identifikasi spektra ¹H dan ¹³C NMR (Tabel 2) dapat disimpulkan bahwa senyawa UK-5 mirip sekali dengan senyawa UK-4, tetapi senyawa UK-5 mengandung gugus methoksi (-OCH₃) pada C-7. Berdasarkan hasil identifikasi tersebut dan data pustaka, senyawa UK-5 diidentifikasi sebagai senyawa turunan isokumarin yang dikenal dengan nama Reticulol, yang juga telah diisolasi dari mikroba *Streptomyces rubrireculae*, *Streptomyces mobaraensis*.

KESIMPULAN

Dari suatu mycelial cake *Streptomyces* sp. 517-02 telah dapat diisolasi satu senyawa antibiotika baru UK-3, dielusidasi sebagai asimetrik dilakton cincin sembilan yang struktur molekulnya mirip dengan UK-2A tetapi tidak mengandung gugus metoksi pada cincin piridin (C-4'). Disamping itu juga diidentifikasi dua senyawa (UK-4 dan UK-5) yang telah diisolasi dari mikroba *Streptomyces rubrireculae*, *Streptomyces mobaraensis* yaitu kelompok isokumarin (reticulol dan turunannya).^{6,7}

Hasil uji aktivitas menunjukkan bahwa UK-3 (tidak mengandung gugus metoksi pada C-4') yang mempunyai struktur molekul mirip UK-2A masih menunjukkan aktivitasnya dalam menghambat pertumbuhan sel kanker P388, B16, KB, COLO201 maupun mikroba seperti *A. niger*, *S. cerevisiae*, *M. mucedo*, dan *P. nitens*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Hasil penelitian yang disajikan pada makalah ini merupakan bagian dari tesis program doctoral di Faculty of Science, Osaka city University, Japan. Dalam kesempatan ini, penulis mengucapkan terima kasih kepada Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan (Monbusho) Jepang atas pemberian beasiswanya. Tak lupa ucapan terima kasih

ditujukan kepada Prof. Takashi Tokoroyama, Prof. Kozo Shibata dan Prof. Hideo Iio, Faculty of Science, Osaka City University atas saran dan pengarahannya selama melakukan penelitian ini. Disamping itu ucapan terima kasih ditujukan kepada Dr. Makoto Taniguchi dan Mr. Masashi Ueki, Faculty of Science, Osaka City University atas kerjasamanya dalam melakukan penelitian ini. Tak lupa pula ucapan terima kasih disampaikan kepada Mr. S. Shimada atas bantuannya dalam pengukuran spektrometri massa.

DAFTAR PUSTAKA

1. Ueki, M., Shibata K., and M. Taniguchi. UK-1, A Novel Cytotoxic Metabolite from *Streptomyces* sp. 517-02. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-chemical and Biological Properties. *J. Antibiotics*. 46(7), 1089-1094 (1993).
2. Shibata K., M. Kashiwada, M. Ueki, and M. Taniguchi. UK-1, A Novel Cytotoxic Metabolite from *Streptomyces* sp. 517-02. II. Structural elucidation. *J. Antibiotics*. 46(7), 1095-1100 (1993).
3. Hanafi, M., Shibata K., M. Ueki, and M. Taniguchi. UK-2, A Novel Cytotoxic Metabolite from *Streptomyces* sp. 517-02. II. Structural Elucidation. *J. Antibiotics*. 46, 1226-1231 (1996).
4. Ueki, M., M. Hanafi, Shibata K., and M. Taniguchi. UK-2, Novel Cytotoxic Metabolite from *Streptomyces* sp. 517-02. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, Physico-chemical and Biological Properties. *J. Antibiotics*. 49(7), 639-643 (1996).
5. Hanafi, M. Studies of Novel Antibiotic Metabolites from *Streptomyces* sp. 517-02. Thesis. Osaka City University (1996).
6. Mitscher, L. A., W. W. Andres, and M. McCrae. The Metabolite of *Streptomyces rubrireculae*. *Experientia*, 20, 258 (1964).
7. Eaton, M. A. W. and D. W. Hutchinson. Isocoumarines from *Streptomyces mobaraensis*. *Tett. Lett.* 1337 (1971).

Tabel 1. Data Spektra ^1H dan ^{13}C NMR untuk Senyawa UK-2A, UK-3 dan 1 (C_6D_6 , 40°C)

	UK-2A		UK-3		1	
	δH	δC	δH	δC	δH	δC
1		171,76 s		171,74 s		
2	2,90 (td, 9,9; 2,9 Hz)	52,45 d	2,91 (td, 9,9; 3,3 Hz)	52,47 d		
3	5,35 (t, 9,9 Hz)	75,53 d	5,35 (t, 9,9 Hz)	75,47 d		
4	4,97 (dq, 9,9; 6,2 Hz)	74,83 d	4,97 (dq, 9,9; 6,2 Hz)	74,86 d		
6		169,98 s		169,92 s		170,34 s
7	5,03 (b)	50,60 d	5,03 (bt)	50,53 d	4,82 (dt, 8,2; 3,7 Hz)	52,82 d
8	5,14 (b)	65,31 t	5,13 (b)	65,18 t	4,13 (dd, 11,3; 3,7 Hz)	
	3,12 (b)		3,05 (b)		4,03 (dd, 11,3; 3,7 Hz)	62,93 t
3-COO-		175,06 s		175,03 t		
4-CH ₃	1,10 (d, 6,2 Hz)	17,75 q	1,10 (d, 6,2 Hz)	17,75 q		
(CH ₂) ₂ -CH-	2,25 (septet, 7,3 Hz)	34,20 d	2,25 (septet, 7,0 Hz)	34,18 d		
(CH ₂) ₂ -CH-	0,97 (d, 7,3 Hz)	18,93 q	0,98 (d, 7,0 Hz)	18,89 q		
			0,96 (d, 7,0 Hz)	18,81 q		
7-NHCO-	8,72 (d, 7,7 Hz)	168,72 s	8,55 (bd, 7,3 Hz)	168,97 s	8,77 9bd, 7,6 Hz)	168,91 s
2'		129,56 s		131,28 s		130,97 s
3'		140,23 s		158,52 s		
4'		149,29 s	6,90 (dd, 8,4; 1,5 Hz)	126,94 d	7,29 (dd, 8,6; 1,5 Hz)	126,11 d
5'	6,08 (d, 5,2 Hz)	156,18 d	6,56 (dd, 8,4; 4,4 Hz)	129,48 d	7,34 (dd, 8,6; 4,3 Hz)	128,90 d
6'	7,67 (d, 5,2 Hz)	109,74 d	6,67 (dd, 4,4; 1,5 Hz)	139,63 d	8,08 (dd, 4,3; 1,5 Hz)	139,82 d
3'-OH	12,34 (s)		12,07 (s)		11,72 (s)	
4'-OCH ₃	3,14 (s)	55,36 q				
1"		138,52 s		138,48 s		
2"/6"	7,01 (t, 7,3 Hz)	128,82 d	7,09 (b, 5H)	128,82 d		
3"/5"	7,02 (t, 7,3 Hz)	128,56 d		128,54 d		
4"	7,02 (t, 7,3 Hz)	126,92 d		126,00 d		
PhCH ₂	3,15 (dd, 13,4; 9,9)	34,20 t	3,12 (dd, 13,3; 11,7)	35,15 t		
	2,73 (dd, 13,4; 2,9)		2,74 (dd, 13,3; 3,3)			

Tabel 2. Data Spektra ^1H dan ^{13}C NMR untuk Senyawa UK-4 dan UK-5(CDCl_3 , 40°C)

	UK-4*		UK-4(Ac)		UK-4(Me)		UK-5*	
	δH	δC	δH	δC	δH	δC	δH	δC
1		166,59 s		158,67 s		166,92 s		166,86 s
3		154,27 s		156,03 s		154,34 s		153,16 s
4	6,12 (bs)	104,75 d	6,19 (bs)	103,23 d	6,16 (d, 0,6 Hz)	104,62 d	6,12 (s)	104,52 d
4a		140,45 s		141,00 s		139,53 s		134,99 s
5	6,56 (d, 2,1 Hz)	103,27 d	6,88 (d, 2,1 Hz)	115,91 d	6,28 (d, 2,1 Hz)	101,04 d	6,64 (s)	103,65 d
6	8,69 (s)	164,29 s		153,29 s				160,15 s
7	6,77 (d, 2,1 Hz)	102,44 d	6,77 (d, 2,1 Hz)	114,88 d	6,45 (d, 2,1 Hz)	100,27 d		135,06 s
8	11,6 (-OH)	167,30 s		155,58 s	11,08 (s.-OH)	163,83 s		155,78 s
8a		99,08		110,45 q		99,92 q		99,78
CH ₃	2,01 (s)	18,95	2,01 (s)	19,50 q	2,24 (s)	19,41 q	2,03 (s)	18,88 q
OCH ₃					3,85 (s)	55,63 q	3,92 (s)	60,29 q
CH ₃ CO				21,00 q				
				167,91 s				
CH ₃ CO				21,12 q				
				169,17 s				

* dalam pelarut $\text{C}_5\text{D}_6\text{N}$

** Korelasi ^1H dan ^{13}C , ditentukan atas dasar hasil pengukuran CH COSY dan INEPT.

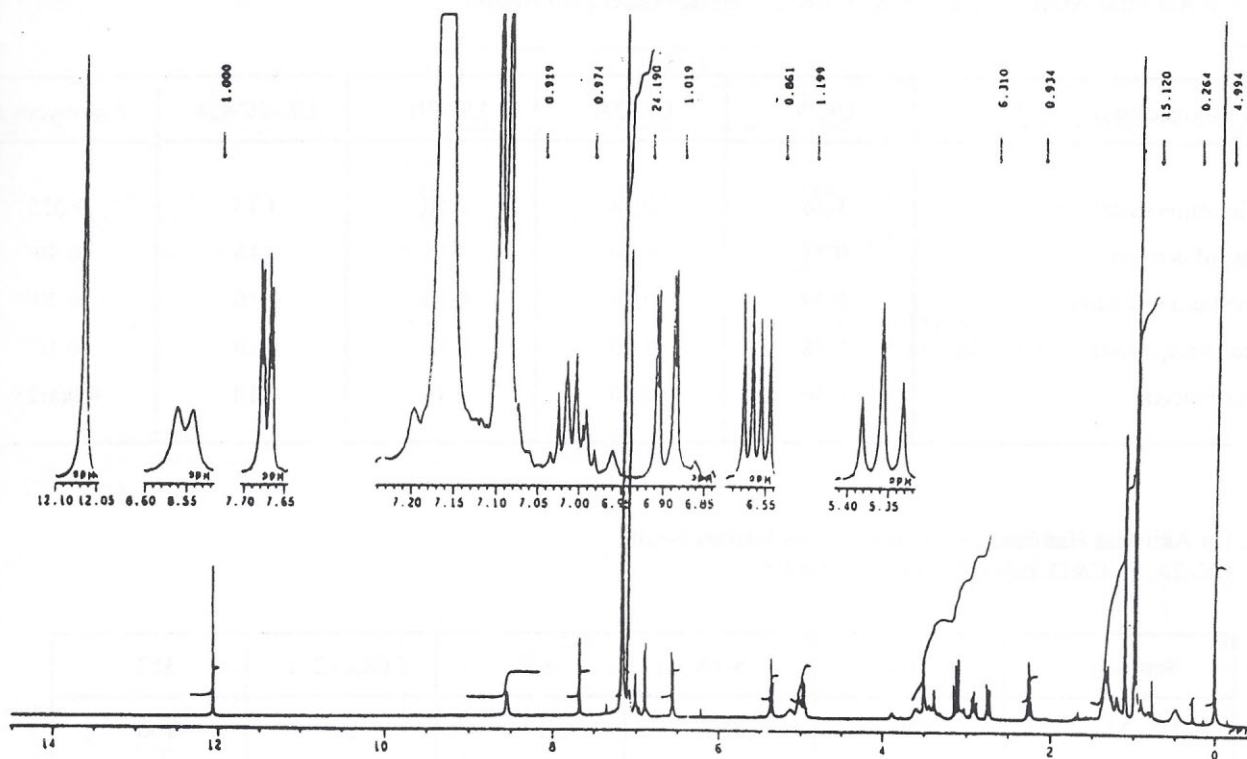
Tabel 3. Uji Aktivitas Antibakteri dari UK-3, UK-2A, B, dan C&D (MIC µg/ml)

Jenis Mikrobakteri	UK-3	UK-2A	UK-2B	UK-2C&D	Antimycin A
<i>Saccharomyces cerivisae</i>	1,56	0,78	1,56	3,13	0.025
<i>Aspergillus niger</i>	0,78	0,39	1,56	0,10	0.39
<i>Neurospora sitophila</i>	0,39	0,10	0,10	0,10	0.20
<i>Phycomyces nitens</i>	0,78	0,10	0,20	0,10	0.10
<i>Mucor mucedo</i>	1,56	0,10	0,39	0,10	0.00625

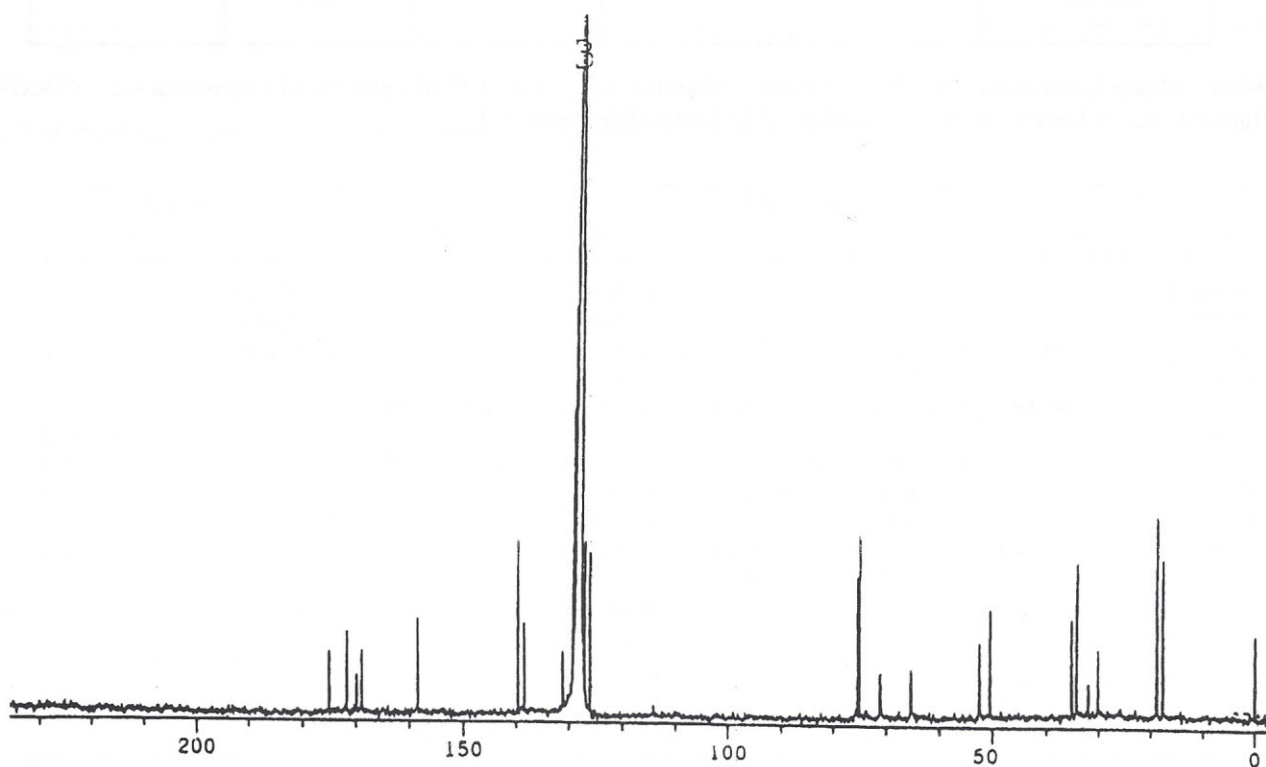
Tabel 4. Uji Aktivitas Hambatan Pertumbuhan Sel Kanker untuk UK-2A, B, C&D, dan UK-3 (IC₅₀ mg/ml)*

Senyawa	P-388	B-16	KB	COLO-201	3T3
UK-2A	100	100	17	35	100
UK-2B	28	30	20	70	95
UK-2C&D	35	60	10	30	95
UK-3	38	18	20	45	100
Antimycin A	0.015	0.02	0.063	0.018	15

* P-388 : Mouse Leukemia P-388; B-16 : Mouse Melanoma; KB : Human Oral Epidermoid Carcinoma KB; COLO-201 : Human Colon Adenocarcinoma COLO-201; 3T3 : Mouse Fibroblast 3T3.



Gambar 2. Spektrum ¹H NMR dari UK-3 (C₆D₆, 40°C)



Gambar 3. Spektrum ¹³H NMR dari UK-3 (C₆D₆, 40°C)